



PCT/FR00/01574

REC'D 14 JUL 2000

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

12 MAI 2000

Fait à Paris, le .....

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **10 JUIN 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907362**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS B**  
DATE DE DÉPÔT **10 JUIN 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
**À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET REGIMBEAU**  
**26, Avenue Kléber**  
**75116 PARIS**

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale  
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent **237890 D10253 NT** références du correspondant **01 45 00 92 02** téléphone **01 45 00 92 02**

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Promoteur permettant l'expression de transgènes dans toute la plante hormis dans la graine**

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**

Forme juridique

**ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE  
SCIENTIFIQUE ET TECHNO...**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**145, rue de l'Université 75007 PARIS**

Pays

**FR**

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES** ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

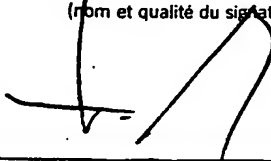
6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 **DIVISIONS** antérieures à la présente demande n° date n° date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

  
**92-1001**



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 07362

TITRE DE L'INVENTION : **Promoteur permettant l'expression de transgènes dans toute la plante hormis dans la graine**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
145, rue de l'Université 75007 PARIS**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**DUBREUCQ Bertrand  
6, rue Fourcade  
75015 Paris, FR**

**LEPINIEC Loïc  
2C rue E. Herriot  
91440 Bures sur Yvette, FR**

**CABOCHE Michel  
5, rue du Thimerais  
78310 Maurepas, FR**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

10 juin 1999

CABINET REGIMBEAU

*[Signature]*  
921253

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

5 La présente invention concerne l'isolement et la caractérisation d'un promoteur qui permet l'expression de transgènes dans la plante adulte, à des fins d'amélioration du développement de la plante, sans que le produit de ce transgène soit présent dans la graine mature et sèche. L'invention a également trait aux plantes transgéniques comportant un gène d'intérêt fusionné à ladite séquence promotrice.

10

Les techniques de biologie moléculaires permettent actuellement de modifier le patrimoine génétique des végétaux pour en changer les composantes qui contrôlent la production, la qualité ou la santé. La spécificité d'expression des transgènes introduits repose essentiellement sur l'utilisation de séquences promotrices de plantes ou de  
15 microorganismes. La recherche de promoteurs spécifiques est donc d'une importance capitale pour les biotechnologies végétales. Les graines constituent une composante importante de l'agriculture, en tant que semences, mais également dans l'alimentation ou l'industrie de transformation. A ce titre, la présence de protéines et produits nouveaux dans la graine peut poser des problèmes. Il apparaît donc intéressant de  
20 pouvoir disposer d'un promoteur actif dans tous les tissus végétatifs, mais inopérant dans les graines.

Les caractéristiques d'une graine vont dépendre des interactions entre la maturation, sous contrôle d'un programme génétique spécifique, et des conditions de  
25 l'environnement qui conditionnent pour une bonne part la production ultérieure. Les mécanismes régulateurs de ces phénomènes restent cependant largement incompris. Il existe donc un réel intérêt à maintenir une bonne qualité des lots de semences. Or, le développement des plantes transgéniques posent de nouveaux problèmes, notamment liés à l'expression de gènes hétérologues dans les graines desdites plantes. En effet, la  
30 présence de protéines ou de polypeptides dans les graines peut avoir des conséquences néfastes sur leur capacité à germer ou sur leur qualité. En outre, si la population se familiarise de plus en plus avec l'idée que les plantes comestibles peuvent être

modifiées génétiquement, des graines comestibles contenant le produit de transgènes pourraient ne pas être facilement acceptées.

5 Ainsi, l'objectif à la base de la présente invention est d'identifier un promoteur qui permettrait une expression forte d'un transgène dans tous les tissus des plantes sauf dans la graine.

10 A cet effet, le piégeage de promoteur (« promoter trapping »), un outil puissant pour disséquer des processus développementaux (Topping and Lindsey 1995 pour revue), a été mise en oeuvre. Cette stratégie est basée sur l'utilisation d'un vecteur de transformation des plantes possédant, à l'une de ses extrémités, un gène rapporteur (GUS ou GFP le plus souvent) sans promoteur. Si l'insertion se réalise dans une région codante et si la séquence du gène rapporteur est en phase, il y aura fusion traductionnelle entre la protéine endogène et la protéine du gène marqueur. Les  
15 stratégies de piégeage de gène présentent un avantage majeur vis-à-vis de la mutagenèse insertionnelle classique car le phénotype (expression du gène rapporteur GUS) est dominant. Cette dominance du phénotype (GUS) permet de suivre les allèles mutés à l'état hétérozygote. Ceci est très intéressant pour l'étude de mutations qui sont létales à l'état homozygote. Cette approche permet également de caractériser un gène  
20 par son expression.

Il a été trouvé lors de l'accomplissement de la présente invention, qu'une insertion d'un gène rapporteur dans le gène codant pour une protéine de type « fatty acid hydroxylase » (FAH) d'Arabidopsis conduit à une expression dans tous les tissus de la  
25 plante sauf dans la graine. Ce type de promoteur est d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques. Il permet de faire exprimer une protéine d'intérêt dès l'imbibition dans tous les tissus de la plante, avec un niveau d'expression élevé, hormis dans la graine. On peut donc, par exemple, protéger une plante contre de nombreux stress biotiques ou abiotiques sans modifier le contenu de sa graine. On peut également  
30 faire exprimer une séquence antisens dirigée contre un gène cible dans tous les tissus sauf dans la graine.

**Description**

Ainsi, la présente invention concerne une séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante hormis dans la graine en maturation et  
5 dans la graine sèche, ladite séquence comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.

De préférence, cette séquence comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité  
10 avec la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.

On entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut facilement être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que le programme DNASIS (Version 2.5 pour  
15 Windows ; Hitachi Software Engineering Co., Ltd, South San Francisco, CA) en utilisant les paramètres standards décrits dans le manuel du fabricant, incorporé dans la description par référence.

Dans ce contexte, les séquences et les pourcentages d'identité peuvent également être obtenus en utilisant les ressources informatiques internet. On peut citer le programme Blast (WWW.ncbi.nlm.nih.gov) et le programme FastDB avec les paramètres suivants  
20 « Mismatch penalty 1.00 ; Gap Penalty 1.00 ; Gap Size Penalty 0.33 ; joining penalty 30.0. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence

On peut également définir les séquences ayant 80% d'identité comme étant des  
25 séquences s'hybridant à la séquence SEQ ID N°1 avec des conditions de stringence fortes. Ces conditions sont présentées dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61, incorporés dans la description par référence.

30 Avantageusement, la séquence selon l'invention possède la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1 suivante :



5'cagctgtagcatcttgatattgctgatactcagccacaagatcgttcatgttactc  
 tctgcttcattaaactccatctcgtccattccttcttctgtgtaccaatgcaagaaag  
 cttatctcaacatcaggctgatataaccaatatcttacttcttttacatttgtgaaat  
 ggaaccaaccatttttctggaaaaagtgctaaccaaacatttgattaaccgtatcac  
 5 tactactttcatttctatcttctgttttcattatgctgactatttaagctccgttgca  
 aatctctaagtttagacataaaaagacaaagactaatcaattgtcatcacaccagcgtcg  
 tcgagtggagctatattaatcgtggatttttaagcattaaagaaacatttctatagtacta  
 aagcaaataaaaataattataatcaaacactatgcttgacactggtcacgtgtactggg  
 agtgaatgattctacatcataagaggccgcacaaaatcctaaaaataagcataatga  
 10 attaatcatttacaatttttattttactcaataagaaaatcgaaagtatgattattat  
 ctagctgccacaatcttcgaatttaatatcttactcaagaagagaccgactttaatcct  
 tgacttttctcattgctctatggaaaatgattaaagcagtcaataaaatcttttgacat  
 tgttggcagaagaccaataattcgaagtctaaaatgtaatcgccacacagtgtatga  
 gtatcctagtatttttttttctttccatataagttgaatttgtaatatatatagtgt  
 15 atgttggtttatttgtggcaacgtacaaaattgggaatcctataagtgcgacgacaagt  
 gacaagacgaggctatgaacagctaattgtatgaagagagccaaaagagcaacaacctg  
 gcacag-3'.

L'invention a également trait à l'utilisation de portion de la séquence SEQ ID N°1  
 20 pour l'identification de fragments capables de promouvoir l'expression d'un gène  
 d'intérêt dans une plante hormis dans la graine. Il est ainsi possible de définir la région  
 minimale de la séquence du promoteur du gène de la FAH pour assurer une expression  
 efficace. En ce sens, le promoteur peut être modifié par addition de séquences telles  
 des enhancers, par délétion de régions non essentielles et/ou non désirées. Le  
 25 promoteur peut comprendre des séquences synthétiques et/ou naturelles.

L'invention concerne un procédé permettant l'isolement et la caractérisation du  
 promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :

- 30 a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité  
 avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence  
 SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des  
 conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une

séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'*Arabidopsis* accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de l'extrémité 5' du gène de la FAH,

b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).

La SEQ ID N°5 correspond à la séquence codante du gène de la FAH d'*Arabidopsis* :

10 DEFINITION : ADNc complet de « *Arabidopsis thaliana* fatty acid hydroxylase Fah1p » (FAH1)

ACCESSION : AF021804

ORGANISME : *Arabidopsis thaliana*, Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Rosidae; Brassicales; Brassicaceae.

Référence : Mitchell, A.G. and Martin, C.E. (1997). Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids; J. Biol. Chem. 272 (45), 28281-28288  
20 MEDLINE 98019193

```

1 atggttgctc agggattcac tgtgcatctt aaaaagcccc ttgtatttca ggttggtcat
61 ctgggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgaccaagga aggcctcgg
25 121 tttttcaga gtgacttttg ggagttcttg acacttacag ttggtgggc agttcctgtc
181 atttggttgc cagttgtagt ctggtgcata tcaaggtcag taagtatggg atgttcactt
241 ccagaaatcg tccaattgt tgtcatggga atattcatct ggacattttt tgaatacgtt
301 cttcaccggt tcgtttcca cataaaaacg aagagttact ggggaaacac tgcacactat
361 ctattacag gatgcataa taagaaacag atgacaaacat tgggtctgt ctttctctct
30 421 actgcaactg cgattttatg cttccgttc tggaacattg cgaaggctat ctcaactcct

```

481 tcaaccgcac ctgcattgtt tgggtggaggc atgctcggat atgtgatgta cgatgtcact  
 541 cattattacc ttcacatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac  
 601 cattgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggatttg gtataacttc gtcgttatgg  
 661 gacatagtct ttgggacact tcccaccaca aaagcccca gaaaagagca atag

5

Il est également possible d'utiliser une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis (introns et exons) qui est accessible à l'homme du métier sous le numéro AC003096 ou une  
 10 amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 (Arabidopsis thaliana, fatty acid hydroxylase Fah1p) suivante :

MVAQGFTVDLKKPLVFQVGHLGEDYEEWVHQPIATKEGPRFFQSDFWEFLTL  
 TVWWAVPVIWLPVWWCISRSVSMGCSLPEIVPIVVMGIFIWTFEYVLHRFVF  
 15 HIKTKSYWGNTAHYLIHGCHHKHPMDHLRLVFPPTATAILCFPFWNIAKAISTP  
 STAPALFGGGMLGYVMYDVTHYYLHHAQPTRPVTKNLKKYHLNHHFRIQDK  
 GFGITSSLWDIVFGTLPTTKAPRKEQ

Ainsi, la séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les  
 20 tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, peut également être caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé décrit précédemment.

25 Un autre aspect de l'invention porte sur une cassette d'expression qui comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice telle que définie ci-dessus. Ladite séquence d'intérêt peut coder pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique.

La cassette peut permettre la co-suppression de l'expression d'un gène caractérisée en  
 30 ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. La séquence

d'intérêt peut également coder pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible. Ceci permet, en couplant avec la surexpression ectopique d'un gène d'intérêt dans les graines, d'empêcher toute expression de ce gène dans d'autres tissus, l'antisens n'y étant pas exprimé. Ceci s'avère tout à fait utile dans le cas où l'on souhaite  
5 surexprimer une protéine dans les graines sans perturber le développement d'autres tissus de la plante.

La cassette selon l'invention peut comprendre en outre un gène marqueur de sélection, une séquence leader contrôlant le transit, la sécrétion ou le ciblage du produit d'expression, dans différents organelles une séquence signal de la terminaison de la  
10 transcription et de la traduction.

On entend par « gène d'intérêt » ou « transgène » dans le cadre de l'invention, un gène notamment sélectionné parmi les gènes codant pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, les gènes perturbateurs codant  
15 pour un produit capable de se substituer et/ou d'inhiber la fonction ou l'expression d'un ARNm, d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. On peut citer par exemple les gènes codant pour des ribozymes contre des ARNm endogènes, des gènes dont le produit de la transcription est au moins complémentaire en partie à un ARNm endogène cible (EP 240 208 incorporé dans la description par référence). On peut  
20 également citer des gènes, dont le produit de la transcription est identique ou similaire aux transcripts de gènes endogènes, qui sont capables d'inhiber par co-suppression l'expression desdits gènes endogènes (Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289, incorporé dans la description par référence). Bien entendu, le gène selon l'invention peut coder pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de sorte à faire  
25 produire ou à favoriser la biosynthèse de métabolites, notamment de métabolites utiles pour l'alimentation humaine ou animale ou pouvant affecter le développement. La séquence promotrice selon l'invention peut induire l'expression d'un gène étranger et être utilisée dans différent types de plantes. Le terme « gène étranger » ou « transgène » est également compris comme définissant toute région d'ADN codante  
30 ou non (protéine, polypeptide, antisens, ARN catalytique, viroïde etc...). Une protéine d'intérêt pour le développement et la production de la plante peut être produite de façon constitutive dans tous les organes de la plante en utilisant ce promoteur sans que

la composition de la graine soit affectée. Les protéines d'intérêt sont, de manière non exhaustive, celles qui permettent une meilleure protection de la plante vis-à-vis

- des stress biotiques : protection contre les pathogènes, bactéries, champignons, insectes, nématodes, parasites ou ravageurs, protection contre les virus et pathogènes intracellulaires, en particulier ceux qui ne sont pas transmis par les graines
- des stress abiotiques : protection contre la chaleur et le froid, le gel, les stress hydriques tels que la sécheresse ou à l'inverse l'anoxie, la pollution (ozone, SO<sub>2</sub>), la photoinhibition et les stress lumineux, la verse, la phytoremédiation, ou les stress nutritionnels occasionnés par une carence ou excès d'un élément nutritif (en particulier un stress salin).

Tout gène d'intérêt peut donc être placé sous le contrôle de la séquence promotrice isolée. Pour l'expression dans les plantes, ce gène peut comporter également des séquences 3' non transcrites possédant des signaux de polyadénylation actifs chez les plantes. Ces séquences peuvent, par exemple, être celles codant la partie 3' transcrite non traduite du gène l'ARN 35S du virus de la mosaïque de choux fleur (35S CaMV) ou la région 3' non-traduite du gène codant la synthèse de la nopaline (NOS) du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le gène d'intérêt selon l'invention peut également être un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.

Un autre aspect de l'invention a trait à un vecteur, notamment un vecteur plasmidique, comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet une cellule de plante transformée avec la cassette ou avec un vecteur comprenant ladite cassette et un kit de transformation de plante comprenant ladite cassette ou ledit vecteur.

La préparation des plasmides, la construction des gènes chimériques et des cassettes d'expression, les restrictions de l'ADN par des endonucléases, la transformation et la confirmation des transformations sont réalisés selon les protocoles standards

(Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning Manual Cold Spring Harbor Laboratory, incorporés dans la description par référence).

La construction des vecteurs utilisables pour les expériences de transformation fait partie des techniques de biologie moléculaire connues et pratiquées de façon routinière dans ce champ d'applications.

Un aspect supplémentaire de l'invention porte sur un procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) Transfert d'une cassette ou d'un vecteur selon l'invention dans des cellules de plantes,
- b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.

Le transfert de l'ADN à l'intérieur des cellules de plante, notamment des cellules de l'albumen ou des cellules totipotentes dérivées d'embryons immatures, peut être effectué par les techniques standards (Plant Cell Report, 10, 595, 1992), en particulier par transfert via *Agrobacterium* (Plant J., 1994. 6, 271), par électroporation (Nature, 1987, 327, 70), laserporation (Barley Genetics, 1991 VI, 231), par polyéthylène glycol, ou par la méthode biolistique dite « gun particule » (Nature, 1987, 327, 70). De manière générale, pour les vecteurs de transformations via une agrobactérie (infiltration in planta Bechtold et al. 1993), les vecteurs de transformation portent des marqueurs de sélection, des bordures d'ADN-T, des sites de clonage, des fonctions de réplication, ainsi que d'autres éléments si nécessaire au bon transfert des transgènes (Bouchez et al. 1993). Les publications ci-dessus mentionnée sont incorporées dans la description par références.

La présente invention a également pour objet une plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé mentionnée ci-dessus.

Par « plante susceptible d'être obtenue », on entend toute plante exprimant un transgène dans ses tissus sauf dans les graines matures et sèches, ladite plante possédant un promoteur selon l'invention. Les plantes obtenues par tout procédé équivalent conduisant au même résultat sont également objet de l'invention. La liste  
 5 des plantes chez lesquelles cette séquence promotrice peut être utilisée inclue plus particulièrement les plantes qui sont utiles pour toute industrie. On peut citer par exemple le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le pois, les plantes ornementales, et les arbres.

10 Ainsi, l'invention concerne une plante, telle que définie ci-dessus, qui exprime dans ses tissus, sauf dans les graines, un gène dont le produit (ARN ou protéine) protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une séquence antisens dirigée contre un gène cible, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une  
 15 protéine ou d'un polypeptide endogène ou une séquence codante pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de métabolites ou un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire. La plante selon l'invention peut également exprimer une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable  
 20 d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que le gène d'intérêt n'est exprimé que dans les graines.

Les graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'invention, qui ne contiennent donc pas le produit d'expression du transgène, sont visées par la présente  
 25 invention, ainsi que leur utilisation en toute industrie.

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-dessous.

30 **Figure 1 : Structure intro / exon de l'ARNm du gène de la FAH**

Les rectangles avec les rayures représentent les introns.

L'échelle est présentée sur la figure.

T29F13 est un bac et TAI234un ADNc.

**Figure 2 : Structure de la région du gène FAH**

PFAH upper et A1 représentent les amorces utilisées pour séquencer le promoteur.

- 5 Les rectangles avec les rayures représentent la partie 5' transcrite non traduite.  
L'échelle est présentée sur la figure.

**Figure 3 : Carte du plasmide pBI 101**

Carte du plasmide pBI101 contenant le promoteur pFAH utilisé.

10

**Exemple 1 : Clonage du promoteur.**

**Matériels et méthodes**

15 **Isolement de la région promotrice de la FAH.**

- La méthode utilisée pour l'extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis* s'inspire de celle décrite par Doyle et Doyle (1990). Le principe repose sur les propriétés détergentes du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB; Sigma Chemical Co., USA) permettant la dénaturation spécifique des macromolécules protéiques et polysaccharidiques. Environ 2g de matériel végétal (plantules cultivées in vitro, âgées de 1 à 2 semaines) sont finement broyés dans l'azote liquide et transférés dans un tube de 50ml de type FALCON (Costar, USA), contenant 7.5ml de tampon d'extraction préchauffé à 65 °C. L'extraction s'effectue à 65°C pendant 30 minutes, sous agitation régulière. Les protéines dénaturées par le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le CTAB du tampon
- 20 sont ensuite extraites dans un volume de chloroforme puis éliminées après centrifugation (4430g, 10min). Les acides nucléiques du surnageant sont précipités par un volume d'isopropanol en présence d'acétate de sodium 3M (1/10, v/v), centrifugés (7900g, 10min) puis rincés à l'éthanol 70%. Le culot est repris en tube Eppendorf dans
- 25 100 $\mu$ l d'eau et les acides ribonucléiques sont éliminés par l'adjonction de 3 $\mu$ l de Rnase
- 30 A à 10mg/ml (Sigma Chemical Co., USA). L'ADN est déprotéinisé puis à nouveau précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation en tube Eppendorf, le culot est lavé, séché, repris dans 50 à 100 $\mu$ l d'eau et conservé à -20°C avant analyses.



### Amplification de l'ADN génomique.

La séquence promotrice a été amplifiée en utilisant la technologie de la PCR qui est une technique connue (Sambrook et al. 1989). Des amorces correspondantes à la  
 5 partie 5'(upper) et 3'(lower) de la séquence promotrice ont été dérivées de la séquence génomique du BAC T29F13 (AC003096) (Voir figure 1). De l'ADN génomique d'une lignée de type sauvage (Ler) a été utilisé comme matrice pour l'amplification de la partie promotrice. Les réactions d'amplification ont été menées sur un thermocycleur (MJ Research PTC100 -96), dans des tubes de 0,2ml (Prolabo) contenant le mélange  
 10 suivant:

1 µl (10ng) ADN, 2µl Tampon 10 x (BRL), 2µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0,8µl dNTP 5mM, 1µl Amorce 1 (10pmole/µl), 1µl Amorce 2 (10pmole/µl), 0,5µl (1U) Taq DNA polymérase (5U/µl), H<sub>2</sub>O qsp 20µl

upper (5'-3') : TTCATGTTACTCTCTGCTTC (SEQ ID N°2)

15 lower (5'-3') GGAAAGGAAACAAATACGGATTTC (SEQ ID N°3)

### Transformation bactérienne.

Les génotypes de bactéries utilisés pour la réalisation des expériences sont :

20 E. Coli souche DH12S (ϕ80 dlacZ ΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR nupG recA1/F'proAB+ lacIqZΔM15).

*Agrobacterium tumefaciens* pmp90C58CE

25 La transformation des bactéries (E.coli souche DH12S) par un plasmide recombiné est réalisée par électroporation (Potter, 1993). Dans une cuve à électroporation (1ml, largeur 0.1cm), 2µl de la réaction de ligature sont mélangés avec 50µl de bactéries décongelées et maintenues dans la glace. La cuve est ensuite placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System; BIO-RAD, FRANCE) et une tension de  
 30 1.25kV est appliquée pendant un temps qui est fonction de la résistance (200Ω) et de la capacité (25µF) du circuit. Un ml de milieu SOC est ajouté pour favoriser la croissance des bactéries et le tout est incubé dans un tube de 10ml pendant 2 heures à 37°C, sous

agitation rotative (220rpm). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes contenant du milieu LB solide supplémenté avec l'antibiotique adéquat et incubées à 37°C pendant une nuit. La sélection des bactéries transformées par le plasmide pMeca recombiné se fait par 0,04mg/ml d'ampicilline en présence de  
 5 0.2mg/ml de X-Gal et de 0.05mg/ml d'IPTG. Pour les autres plasmides recombinés, la sélection des bactéries s'effectue sur un milieu LB avec l'antibiotique adéquat à une concentration finale de 0,04mg/ml.

#### Activité $\beta$ -glucuronidase.

- 10 Pour les graines, un semis est effectué sur deux épaisseurs de papier Whatman 1M de 4,7cm (Maindstone, Angleterre) imbibé par 2ml d'eau stérile. Après 48h d'imbibition dans une boîte saturée en eau, les graines sont raclées et placées dans un tube Eppendorf auquel sont ajoutés 100 $\mu$ l de tampon d'infiltration (100mM de Tampon phosphate pH7,2, 10mM EDTA, Triton X100 0,1% v/v) supplémenté en X-Gluc (5-  
 15 Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronic Acid). Le X-Gluc est dissout dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration stock: 100 $\mu$  (10mg/100 $\mu$ l). Le tampon d'infiltration est supplémenté au 1/100e extemporanément avec le stock de X-Gluc. Pour les autres tissus, les échantillons sont placés directement dans le tampon d'infiltration et la coloration est ensuite réalisée selon le même protocole.
- 20 L'infiltration est effectuée sous-vide (dans une cloche à vide):
- le vide est cassé 2 fois.
  - le vide est maintenu pendant 1 heure, puis les échantillons sont placés à 37°C pour la nuit.

#### 25 Résultats

Des analyses préliminaires ont indiqué qu'une enzyme impliquée dans le métabolisme des lipides (la « Fatty Acid Hydroxylase » : FAH) pourrait avoir une expression correspondant au type de promoteur ayant les caractéristiques recherchées.

30

La séquence du gène en question a été obtenue grâce aux séquences provenant du séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis thaliana* et se trouve être localisée

sur le BACT29F13. Une séquence exprimée (EST TAI234) a été identifiée dans les bases de données et semble correspondre à une séquence pleine longueur de l'ARNm de la FAH. Ceci a permis l'identification de la séquence 5' transcrite non traduite et de l'emplacement prévu de la séquence promotrice. La structure intron/exon a été déduite, au niveau de la partie transcrite non traduite, de l'alignement du BAC avec l'EST TAI234 (figure 1).

Le promoteur a été amplifié par PCR à partir de l'amorce pFAH/upper et l'amorce A1, placé dans la partie 5' transcrite non traduite (figure 2). Une étude de la séquence a montré que la séquence amplifiée possède une boîte TATA putative à -100pb du site d'initiation présumé de la transcription (d'après l'ADNc pleine longueur) et une boîte CCAAT à -190pb de ce même début de transcription. Le fragment de PCR amplifié (932pb) a été cloné dans un vecteur pGEM-T (PROMEGA), séquencé, puis introduit dans un vecteur binaire (pBI101, Clontech) contenant un gène rapporteur GUS sans promoteur (figure 3). Cette construction a ensuite été introduite par transformation in planta, via *Agrobacterium*, dans des plantes de type sauvage (écotype Ws). Treize transformants primaires ont été obtenus, qui ont été testés pour leur activité GUS pendant leur développement.

## **Exemple 2 : Expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de gène de la FAH.**

L'expression est forte dès 20 heures après le début de l'imbibition dans l'embryon. Durant le développement, l'expression est forte dans tous les tissus, avec une certaine préférence pour les tissus vasculaires.

Ces résultats démontrent que la séquence promotrice isolée confère bien un profil d'expression très spécifique au gène rapporteur utilisé (GUS). le promoteur est actif tout au long du développement de la plante, dans tous les tissus testés (feuilles, fleurs, tiges, racines etc...) sauf dans la graine en cours de maturation (Voir tableau I ci-dessous).

Tableau 1 : Profil d'expression du gène rapporteur GUS

	cotylédons	feuille adulte	Racines	fleur	silique	graines en germination	Graines sèches
1	++	+++	++	++	+++	+++	-
2	+++	+++	++	++	+++	+++	-
3	+++	+++	++	++	nd	++	-
4	+++	+++	++	++	nd	++	-
5	+++	+++	++	++	nd	+++	-
6	+	+++	++	++	nd	+++	-
7	+++	+++	++	++	+++	+	-
8	++	+++	++	++	+++	+++	-
9	+++	+++	++	++	+++	++	-

- 5 L'expression du marqueur confirme la fonctionnalité du promoteur et sa spécificité. Ce type de promoteur est donc d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques, telles que l'expression d'une toxine anti-insecte (type Bt) dans les plantes et l'expression de tout transgène permettant d'améliorer, de manière quantitative ou qualitative, le développement et la croissance de la plante sans que la
- 10 protéine codée par le transgène soit présente dans la graine.

REFERENCES

- 5 Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1194-9
- 10 Bouchez D., Camilleri C. Caboche M. (1993). A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1188-1193
- Doyle J.J. and Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue . Focus; 12: 13-15
- 15 Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). . . ; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.

## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA

<120> PROMOTEUR PERMETTANT L'EXPRESSION DE TRANSGENES DANS  
TOUTE LA PLANTE HORMIS DANS LA GRAINE

<130> FAH

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 932

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> promoteur de la FAH chez Arabidopsis thaliana.

<400> 1

```

cagctgtagc atcttgatat tgctgatact cagccacaag atcgttcatg ttactctctg 60
cttcattaaa ctccatctcg tccattcctt cttctgtgta ccaatgcaag aaagcttattc 120
tcaacatcag gctgatataa ccaatatctt acttctttta catttggtgaa atggaaccaa 180
cccatttttc tggaaaaagt gctaaccaaa catttgatta accgtatcac tactactttc 240
atttctatct tctgtttcat tatgctgact atttaagctc cgttgtcaaa tctctaagtt 300
agacataaaa gacaaagact aatcaattgt catcacacca gcgtcgtcga gtgagctata 360
ttaatcgtag attttaagca ttaaagaaac attctatagt actaaagcaa ataaaataat 420
tataatcaaa cactatgctt gacactggtc acgtgtactg gtagtgaatg attctacatc 480
ataagaggcc gcatcaaaat cctaaaaata agcataatga attaatcatt tacaaaatttt 540
attttactca ataagaaaat cgaaagtatg attattatct agctgccaca atcttcgaat 600
ttaatattta ctcaagaaga gaccgacttt aatccttgac tttctcattg ctctatggaa 660
aatgattaaa gcagtcgaata aaatcttttg acattgttgg cagaagacca ataattcgaa 720
gtctaaaatg taatcgtcca cacagtgtat gagtatccta gtattttttt tcttttccat 780
ataagttgaa tttgtaatat atatagtgtg atgttggtta tttgtggcaa cgtacaaaat 840
tggaatcct ataagtgcga cgacaagtga caagacgagg ctatgaacag ctaatgtatg 900
aagagagcca aaagagcaac aacctggcac ag 932

```

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce upper

<400> 2

ttcatgttac tctctgcttc

20

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce lower

&lt;400&gt; 3

ggaaaggaaa caaatacggg ttc

23

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fatty acid hydroxylase Fah 1p

&lt;400&gt; 4

Met Val Ala Gln Gly Phe Thr Val Asp Leu Lys Lys Pro Leu Val Phe  
 1 5 10 15

Gln Val Gly His Leu Gly Glu Asp Tyr Glu Glu Trp Val His Gln Pro  
 20 25 30

Ile Ala Thr Lys Glu Gly Pro Arg Phe Phe Gln Ser Asp Phe Trp Glu  
 35 40 45

Phe Leu Thr Leu Thr Val Trp Trp Ala Val Pro Val Ile Trp Leu Pro  
 50 55 60

Val Val Val Trp Cys Ile Ser Arg Ser Val Ser Met Gly Cys Ser Leu  
 65 70 75 80

Pro Glu Ile Val Pro Ile Val Val Met Gly Ile Phe Ile Trp Thr Phe  
 85 90 95

Phe Glu Tyr Val Leu His Arg Phe Val Phe His Ile Lys Thr Lys Ser  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Asn Thr Ala His Tyr Leu Ile His Gly Cys His His Lys  
 115 120 125

His Pro Met Asp His Leu Arg Leu Val Phe Pro Pro Thr Ala Thr Ala  
 130 135 140

Ile Leu Cys Phe Pro Phe Trp Asn Ile Ala Lys Ala Ile Ser Thr Pro  
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Pro Ala Leu Phe Gly Gly Gly Met Leu Gly Tyr Val Met  
 165 170 175

Tyr Asp Val Thr His Tyr Tyr Leu His His Ala Gln Pro Thr Arg Pro  
 180 185 190

Val Thr Lys Asn Leu Lys Lys Tyr His Leu Asn His His Phe Arg Ile  
 195 200 205

Gln Asp Lys Gly Phe Gly Ile Thr Ser Ser Leu Trp Asp Ile Val Phe  
 210 215 220

Gly Thr Leu Pro Thr Thr Lys Ala Pro Arg Lys Glu Gln

225

230

235

<210> 5  
 <211> 714  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <223> Sequence codante pour la fatty acid hydroxylase  
 Fah 1P

<400> 5  
 atgggttgctc agggattcac tgtggatctt aaaaagcccc ttgtatttca gggttggtcat 60  
 cttggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgaccaagga aggccctcgg 120  
 ttttttcaga gtgacttttg ggagttcttg acacttacag tttggtgggc agttcctgtc 180  
 atttggttgc cagttgtagt ctggtgcata tcaaggtcag taagtatggg atgttcactt 240  
 ccagaaatcg tccaattgt tgtcatggga atattcatct ggacattttt tgaatacgtt 300  
 cttcaccggt tcgttttcca cataaaaacg aagagttact ggggaaacac tgcacactat 360  
 cttattcacg gatgccatca taagcaccgg atggaccacc ttcggctcgt ctttcctcct 420  
 actgcaactg cgattttatg ctttccgttc tggaacattg cgaaggctat ctcaactcct 480  
 tcaaccgcac ctgcattgtt tgggtggaggc atgctcggat atgtgatgta cgatgtcact 540  
 cattattacc ttcaccatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac 600  
 catttgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggatttg gtataacttc gtcggttatgg 660  
 gacatagtct ttgggacact tcccaccaca aaagcccca gaaaagagca atag 714



### REVENDICATIONS

- 5 1. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.
- 10 2. Séquence selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
- 15 3. Séquence selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
4. Procédé permettant l'isolement et la caractérisation du promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :
  - 20 a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence  
25 complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de l'extrémité 5' du gène de la FAH,
  - b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).
- 30 5. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité

avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon la revendication 4.

- 5 6. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3 et 5 pour l'identification de fragments de la séquence SEQ ID N°1 permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche.
- 10 7. Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice selon l'une des revendications 1 à 3 et 5.
- 15 8. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, ou qui est impliquée dans le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.
- 20 9. Cassette d'expression selon la revendication 7 permettant la co-suppression d'un gène caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.
- 25 10. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible.
- 30 11. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une enzyme impliquée dans la production de métabolites par une plante.
- ~~12. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'une des revendications 7 à 10.~~
- 35 13. Cellule de plante transformée avec une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou un vecteur selon la revendication 12.

14. Kit de transformation de plante comprenant une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou un vecteur selon la revendication 12.
- 5 15. Procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) Transfert d'une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou d'un vecteur selon la revendication 12 dans des cellules de plantes,
- 10 b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.
16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi les cellules embryonnaires provenant d'un embryon immature.
- 15 17. Procédé selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce que le transfert est effectué en utilisant *Agrobacterium*, de préférence *Agrobacterium tumefaciens*.
18. Plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé selon l'une des revendications 15 à 17.
- 20 19. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une séquence antisens dirigée contre un gène cible.
- 25 20. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.
- 30 21. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que la protéine d'intérêt n'est exprimée que dans les graines.
- 35

22. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, une séquence codante pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de métabolites, pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une protéine contrôlant le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.
- 5
23. Plante selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce qu'elle est choisie notamment parmi le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le pois, les plantes ornementales, et les arbres.
- 10
24. Graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 23 caractérisées en ce qu'elles ne contiennent pas le produit d'expression du transgène.

**Description**

Ainsi, la présente invention concerne une séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, ladite séquence comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.

De préférence, cette séquence comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.

On entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut facilement être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que le programme DNASIS (Version 2.5 pour Windows ; Hitachi Software Engineering Co., Ltd, South San Francisco, CA) en utilisant les paramètres standards décrits dans le manuel du fabricant, cité dans la description par référence.

Dans ce contexte, les séquences et les pourcentages d'identité peuvent également être obtenus en utilisant les ressources informatiques internet. On peut citer le programme Blast ([WWW.ncbi.nlm.nih.gov](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov)) et le programme FastDB avec les paramètres suivants : « Mismatch penalty 1.00 ; Gap Penalty 1.00 ; Gap Size Penalty 0.33 ; joining penalty 30.0. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala R. Liss, Inc, cité dans la description par référence

On peut également définir les séquences ayant 80% d'identité comme étant des séquences s'hybridant à la séquence SEQ ID N°1 avec des conditions de stringence fortes. Ces conditions sont présentées dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61, cités dans la description par référence.

Avantageusement, la séquence selon l'invention possède la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1 suivante :

d'intérêt peut également coder pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible. Ceci permet, en couplant avec la surexpression ectopique d'un gène d'intérêt dans les graines, d'empêcher toute expression de ce gène dans d'autres tissus, l'antisens n'y étant pas exprimé. Ceci s'avère tout à fait utile dans le cas où l'on souhaite  
5 surexprimer une protéine dans les graines sans perturber le développement d'autres tissus de la plante.

La cassette selon l'invention peut comprendre en outre un gène marqueur de sélection, une séquence leader contrôlant le transit, la sécrétion ou le ciblage du produit d'expression, dans différents organelles une séquence signal de la terminaison de la  
10 transcription et de la traduction.

On entend par « gène d'intérêt » ou « transgène » dans le cadre de l'invention, un gène notamment sélectionné parmi les gènes codant pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, les gènes perturbateurs codant  
15 pour un produit capable de se substituer et/ou d'inhiber la fonction ou l'expression d'un ARNm, d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. On peut citer par exemple les gènes codant pour des ribozymes contre des ARNm endogènes, des gènes dont le produit de la transcription est au moins complémentaire en partie à un ARNm endogène cible (EP 240 208 cité dans la description par référence). On peut également  
20 citer des gènes, dont le produit de la transcription est identique ou similaire aux transcripts de gènes endogènes, qui sont capables d'inhiber par co-suppression l'expression desdits gènes endogènes (Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289, cité dans la description par référence). Bien entendu, le gène selon l'invention peut coder pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de sorte à faire produire  
25 ou à favoriser la biosynthèse de métabolites, notamment de métabolites utiles pour l'alimentation humaine ou animale ou pouvant affecter le développement. La séquence promotrice selon l'invention peut induire l'expression d'un gène étranger et être utilisée dans différent types de plantes. Le terme « gène étranger » ou « transgène » est également compris comme définissant toute région d'ADN codante ou non (protéine, polypeptide, antisens, ARN catalytique, viroïde etc...). Une protéine d'intérêt pour le  
30 développement et la production de la plante peut être produite de façon constitutive dans tous les organes de la plante en utilisant ce promoteur sans que

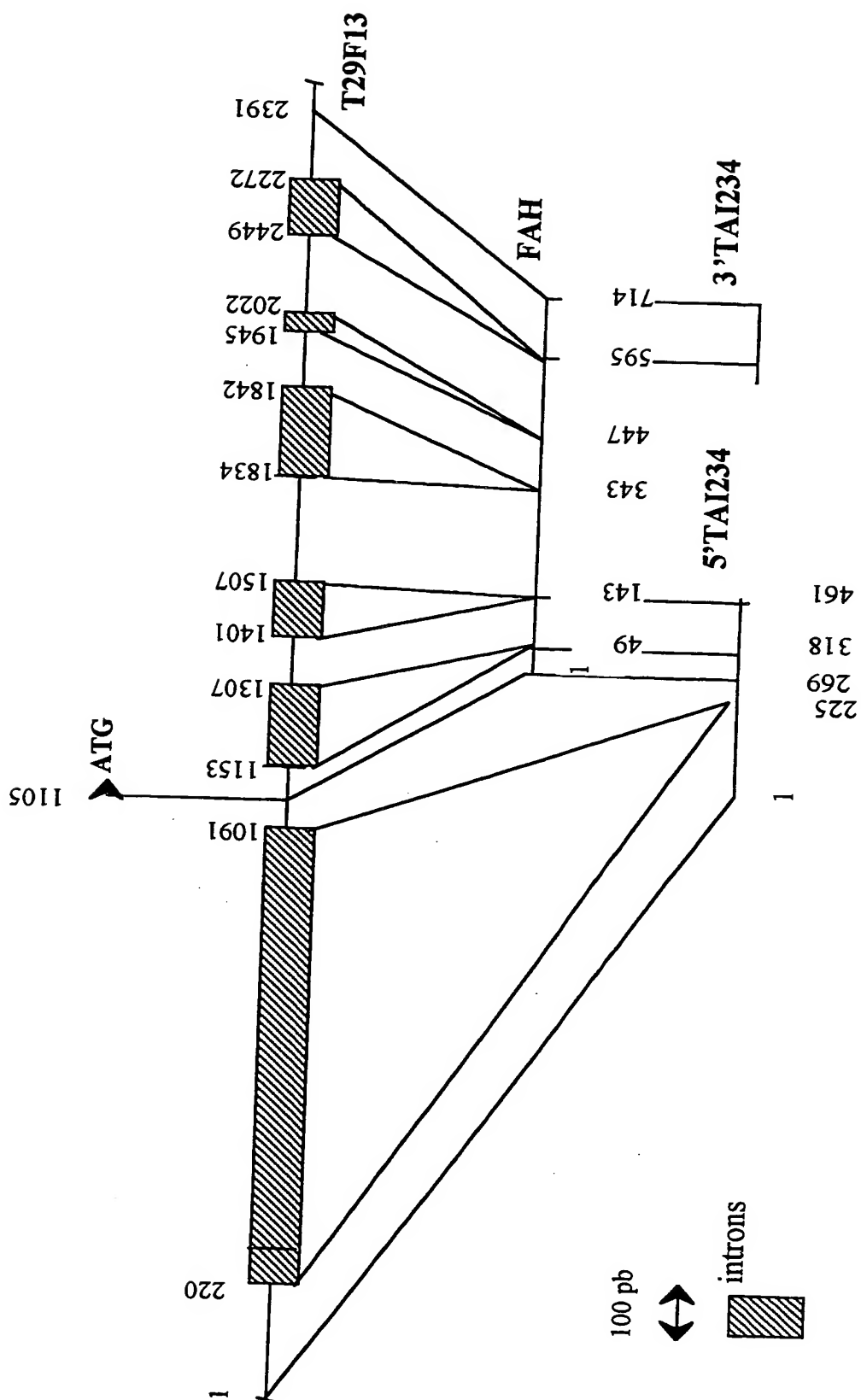


FIGURE 1

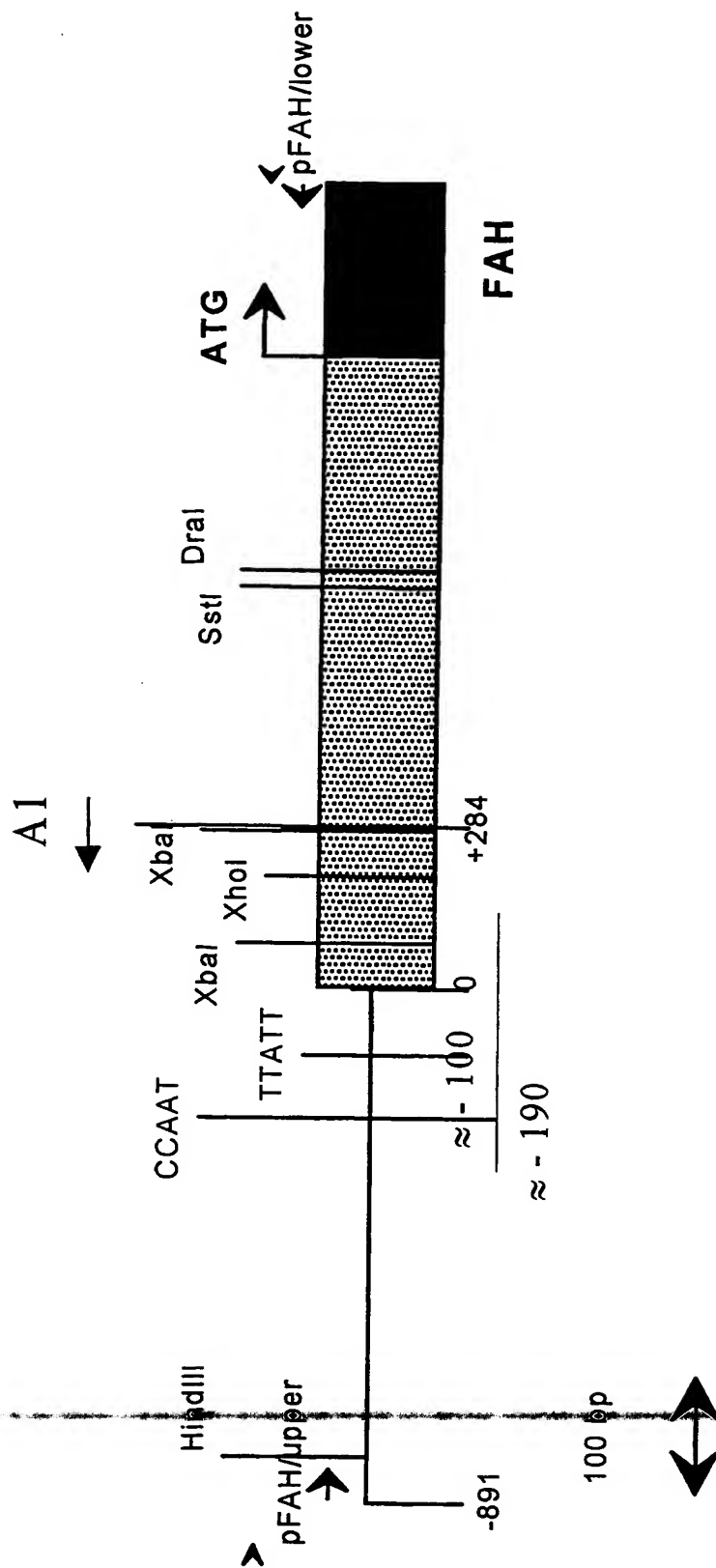


FIGURE 2



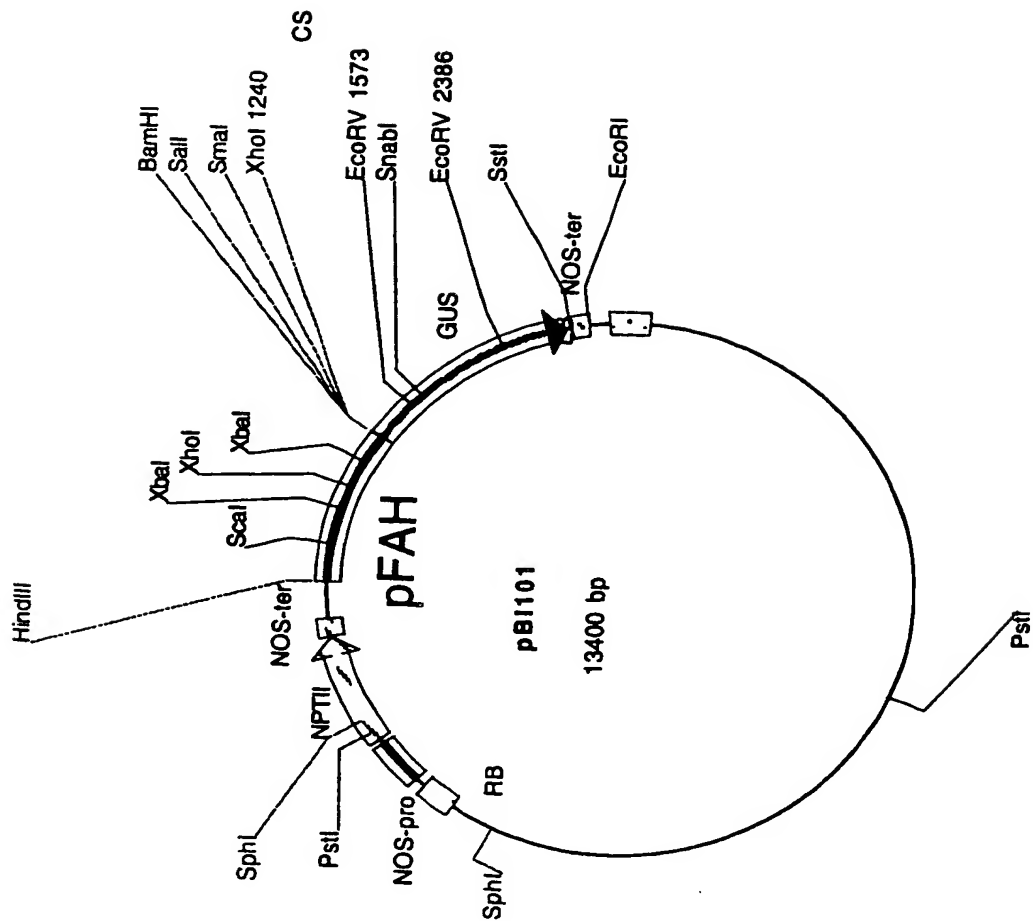


FIGURE 3

